

THESIS

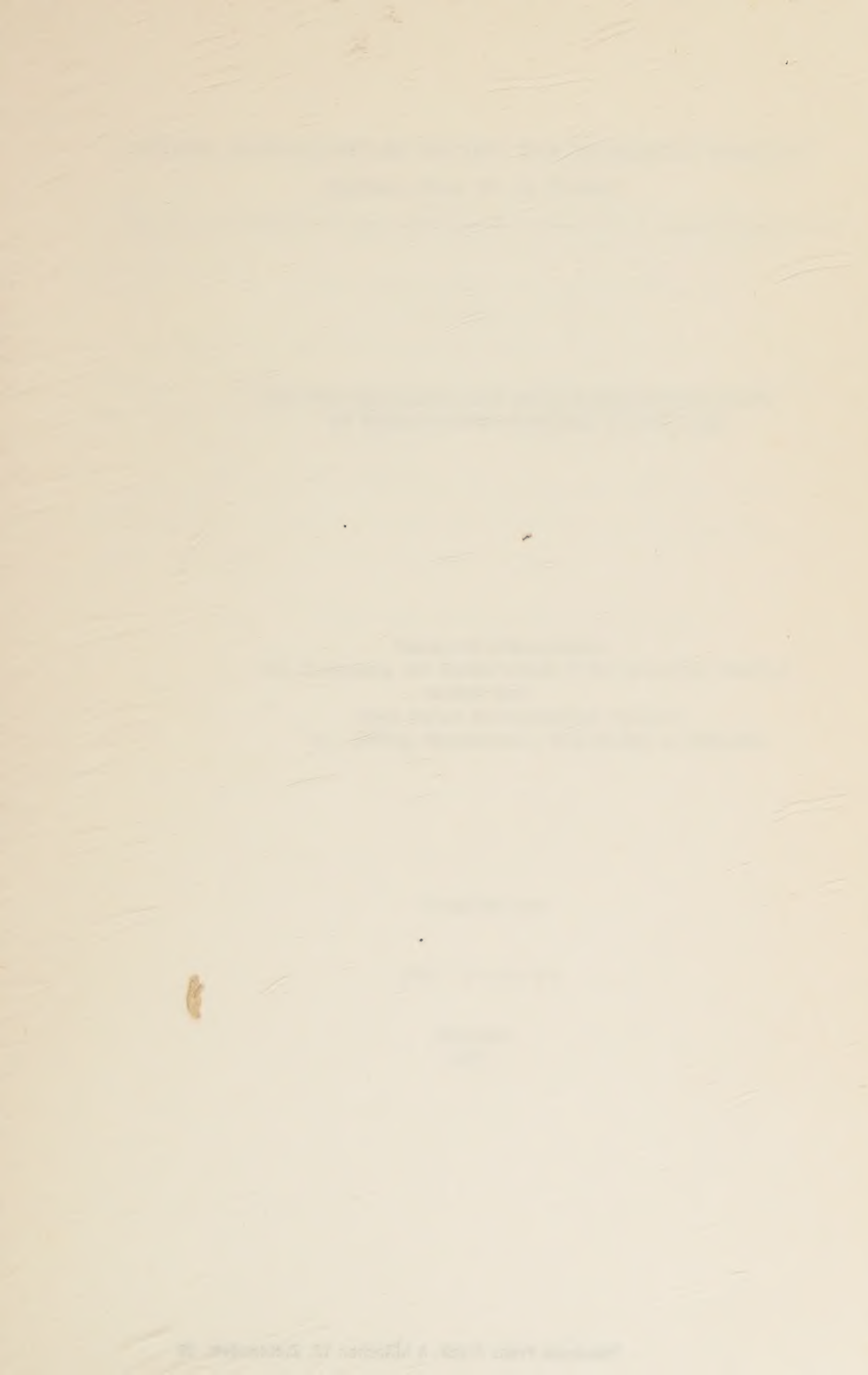
MÜNICH

1967

DIE WECHSELZAHL
DER ACETYLCHOLINESTERASE
IM SARKOPLASMATISCHEN
RETIKULUM

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

WOLF  ENDRES



AUS DEM PHYSIOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. K. Kramer

DIE WECHSELZAHL DER ACETYLCHOLINESTERASE
IM SARKOPLASMATISCHEN RETIKULUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolf Endres

München
1967

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Privatdozent Dr. G. Ulbrecht
Mitberichterstatter:	Professor Dr. K. Kramer
Dekan:	Professor Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.1967

Herrn Privatdozenten Dr. G. Ulbrecht danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die freundliche, unermüdliche Unterstützung in jeder Hinsicht.

Mein Dank gilt gleichzeitig auch dem Direktor des Physiologischen Institutes der Universität München, Herrn Professor Dr. K. Kramer für die Übernahme des Coreferates und die Durchsicht der Arbeit.

Auch Herrn Professor Dr. W. Stich (I. Medizinische Klinik der Universität München) möchte ich aufrichtig für den großzügig zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz in seinem Isotopenlabor danken.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Experimenteller Teil	
a) Gewinnung des Sarkoplasmatischen Retikulum	5
b) Bestimmung der Fermentaktivität der AChE	5
c) Radioaktive Signierung der aktiven Gruppen der AChE	6
d) Messung der P^{32} -Signierung	8
e) Stickstoff-Bestimmung	8
III. Ergebnisse	
a) Fermentaktivität der AChE des Sarkoplasmatischen Retikulum. Spontanhydrolyse, Spontansäuerung.	9
b) Fermentaktivität der AChE als Funktion der DFP-Konzentration	11
c) Dauer der Inkubation in DFP, die zu einer irreversiblen Hemmung der AChE führt	12
d) Abhängigkeit des Schutzeffektes des BCh für die aktiven Gruppen der AChE im SPR von der BCh-Konzentration	17
e) Erschöpfendes Auswaschen überschüssiger Radioaktivität	17
f) Übersicht der Arbeitsgänge	19
g) Berechnung der Wechselzahl	22
h) Die Wechselzahl	22
i) Berechnung der Anzahl der aktiven Gruppen in einer terminalen Zisterne	24
IV. Diskussion	26
V. Zusammenfassung	32
Literaturverzeichnis	33
Lebenslauf	36

Abkürzungen

ACh	= Acetylcholin
AChE	= Acetylcholin-Esterase
BCh	= Butyrylcholin
ChE	= Cholin-Esterase
DFP	= Di-isopropyl-fluorphosphat
EDTA	= Äthylen-diamin-tetraessigsäure
RL	= Reaktionslösung (60 mM KCl, 90 mM NaCl, 40 mM MgCl ₂)
SPR	= Sarkoplasmatisches Retikulum
ttS	= transversales tubuläres System
tZ	= terminale Zisterne

I.

Einleitung

Es besteht Übereinstimmung darüber, daß ATP die unmittelbare Energiequelle der Kontraktion ist. Durch enzymatische Hydrolyse wird die chemische Energie des ATP für die Kontraktion verfügbar gemacht. Nicht nur die Kontraktion, sondern auch die ATP-Spaltung wird durch die fibrillären Proteine bewirkt; die enzymatisch aktive Gruppe ist nämlich im L-Myosin lokalisiert (Hasselbach, 1952, und Davies, 1963). Es wird das Mg-ATP gespalten (Weber, A., et al., 1962, und Hasselbach, 1964). Diese Myosin-ATPase wird durch Aktin auf etwa die 10-fache Umsatzrate aktiviert. Dazu sind Ca-Ionen erforderlich, wobei eine 1:1-Aktivierung vorliegt, d.h. jedes ATPase-tragende Myosinmolekül benötigt zu seiner Aktivierung neben Aktin ein Ca-Ion. Da die Myosin-Konzentration im Skelettmuskel $\sim 10^{-4}$ M ist ¹⁾, erfordert die mit Aktin versorgte Myosin-ATPase zur vollen Aktivierung eine Konzentration freier Ca-Ionen von mindestens 10^{-4} M. Solange die Ca-Ionen-Konzentration im Myoplasma $\sim 10^{-4}$ M ist, muß deshalb das kontraktile System im Zustand der Kontraktion vorliegen. Portzehl et al. (1964, 1965) haben durch Injektion von Ca-Ionen in die intakte Faser der Seespinne *Maia Squinado* die experimentelle Bestätigung erbracht, daß in der natürlichen Ordnung der Fibrille diese Kontraktionsbedingungen den in vitro gewonnenen Ergebnissen voll entsprechen.

1) Nach Hasselbach und Schneider (1951) beträgt der Anteil des L-Myosins am Gesamtprotein des Skelettmuskels 38 %. Bei einem Proteingehalt des Muskels von 20 % ergibt sich sein L-Myosin-Anteil mit 7,6 %, womit bei einem Molekulargewicht des L-Myosins von 800 000 (Portzehl, 1950) eine L-Myosin-Konzentration im Skelettmuskel von $9,5 \cdot 10^{-5}$ M berechnet wird.

Die Fähigkeit, Ca-Ionen zu akkumulieren, ist den terminalen Zisternen (tZ) des Sarkoplasmatischen Retikulum (SPR) zuzuordnen (Ebashi und Lipmann, 1962, Hasselbach, 1964, und Franzini-Armstrong, 1964). Die dabei geleistete Konzentrationsarbeit wird durch ATP-Spaltung unterhalten. Die ATPase ist in der Membran lokalisiert und wird durch Ca-Ionen aktiviert. Die aktive Gruppe dieser Hydrolase scheint an der myoplasmatischen Membranseite zu sein. Diese Befunde sind durch die Arbeitsgruppe von Podolsky (Costantin, 1965, 1966) bestätigt worden. Dieses Ca-pumpende System der tZ kann ein Konzentrationsgefälle der Ca-Ionen von mehr als 3 Zehnerpotenzen aufrechterhalten. Da nach Peachey (1965) die tZ 5% des Volumens einer Faser vom *M. sartorius* des Frosches einnehmen, ist zur Erschlaffung dieser Faser nur eine Konzentrierung der Ca-Ionen im Inneren der tZ auf das 20-fache erforderlich.

Diese Befunde haben zu einer befriedigenden Klärung der Vorgänge geführt, die die Erschlaffung des Skelettmuskels bewirkt: Wenn die kritische Ca-Ionen-Konzentration im Myoplasma unterschritten ist, d.h. wenn die im Myoplasma befindliche Konzentration der freien Ca-Ionen nicht mehr zur Aktivierung der Myosin-ATPase ausreicht, kann das an die Fibrillen gebundene Mg-ATP nicht mehr hydrolysiert werden. Da nicht gespaltenes, an die Fibrillen gebundenes ATP "Weichmacher"-Wirkung hat (Weber, H. H., 1960), erschlafft der Muskel.

Noch völlig unbekannt sind die Vorgänge, die zur Ca-Freisetzung aus den tZ führen. Die Frage nach dem Mechanismus dieses Prozesses ist zugleich die Frage nach der Ankopplung der Kontraktion an die Erregung. Denn es ist naheliegend anzunehmen, daß das "Anstellen" der Kontraktion den reziproken Vorgang des "Abstellens" darstellt: Wenn das Ca dem Konzentrationsgefälle folgend aus dem intrazisternalen Raum durch die plötzlich für Ca-Ionen permeabel gewordene Zisternenmembran in den myoplasmatischen Raum diffundiert, beginnt die Kontraktion.

Das morphologische Substrat, das die Ca-Freisetzung aus den tZ vom transversalen tubulären System (ttS) aus induziert, wird in dem engen Kontaktbereich zwischen ttS und tZ -in den Dyaden und Triaden- gesucht. Diese Berührungszonen sind in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Peachey (1962, 1964, 1965) optisch dichter als die übrigen Membranabschnitte beider Systeme. An diesen Flächen möglicher synaptischer Funktion muß der entscheidende Prozeß ablaufen, der zur Freisetzung der Ca-Ionen aus den tZ führt. Nach Peachey (1965) werden etwa 80 % der Oberfläche des ttS von tZ bedeckt. Nach Arbeiten von H. E. Huxley (1964) und Endo (1964) kommuniziert das Lumen des ttS mit dem Extrazellulärraum. Selbst Makromoleküle von der Größe des Ferritins diffundieren aus dem Extrazellulärraum in das ttS hinein. Fener haben Freygang (1963) und Freygang und Peachey (1964) nach Erregungssalven an Skelettmuskelfasern späte Nachpotentiale beobachtet. Diese werden auf eine Anhäufung von K-Ionen im Lumen des ttS zurückgeführt, die erregungsbedingt aus dem Intrazellulärraum ausgeströmt sind. Diese beiden Argumente stützen die morphologische Beobachtung, nach der zwischen dem Sarkolemm und der Membran des ttS Kontinuität besteht. Daraus kann berechtigterweise geschlossen werden, daß die über das Sarkolemm hin sich ausbreitende Erregung durch die Membran des ttS in die Tiefe der Faser geleitet wird. Der Kontaktbereich zwischen ttS und tZ wäre dann ein Bereich der elektrosekretorischen Kopplung. Hierbei wird unter Sekretion die Entlassung der in den tZ akkumulierten Ca-Ionen in das Myoplasma hinein verstanden. Man kann diesen Kontaktbereich mithin als eine Synapse im weiteren Sinne ansehen.

Die ACh-spaltende Eigenschaft der tZ des Skelettmuskels (Ulbrecht und Kruckenberg, 1965) und des Herzmuskels (Ulbrecht, 1966, und Ulbrecht, persönliche Mitteilung) legt die Vermutung nahe, daß im Kopplungsbereich der Triaden das ACh-AChE-System eine funktionelle Bedeutung haben könnte. Es ist von denselben Autoren gezeigt worden, daß das ACh-spaltende Enzym die reaktionskinetischen Eigenschaften der AChE besitzt. Allerdings unterscheidet sich der Temperaturkoeffizient der enzymatischen ACh-Spaltung zwischen 5 und 37° C von dem der spontanen Hydrolyse nur um einen Faktor von 1,2 - 1,3.

Die funktionelle Bedeutung dieser AChE könnte auf eine Beeinflussung der Permeabilität der Zisternenmembran für Ca-Ionen durch das ACh-AChE-System hinweisen. Allerdings setzt ACh in Konzentrationen zwischen $0,1$ und $10 \mu\text{M}$ aus präparativ gewonnenem SPR, das Ca-Ionen akkumuliert hat, nicht genügend Ca-Ionen frei, um die Fibrillen-ATPase zu aktivieren (Ulbrecht und Mayer, 1966). Hierbei ist es gleichgültig, ob Calcium als Ca-Oxalat oder Ca-Phosphat im Inneren der Vesikel des SPR festgehalten wird oder ob die Akkumulation ohne Anwesenheit eines Anions, mit dem es ein vergleichbar kleines Ionenprodukt besitzt, erfolgt. Es besteht deshalb ein starkes Bedürfnis, die AChE der tZ genauer zu beschreiben und quantitative Daten der Rasterdichte der AChE auf der Membran der tZ zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wird die Wechselzahl der AChE im SPR bestimmt. Sie gibt die Anzahl der pro aktiver Gruppe des Fermentes in einer Minute umgesetzten ACh-Moleküle an. Ferner wird die Anzahl der aktiven Gruppen der AChE in einer tZ in erster Näherung bestimmt.

II.

Experimenteller Teil

a) Gewinnung des SPR

Muskelstücke vom Rücken und von den Hinterläufen eines frisch geschlachteten und gut ausgebluteten Kaninchens werden von Fett, Faszien, Sehnen, Gefäßen und Nerven soweit wie möglich befreit und in eine eiskalte Lösung von 100 mM KCl, 2 mM EDTA und 5 mM Phosphatpuffer nach Sørensen bei pH 7 gelegt. Diese Muskelstücke werden anschließend durch einen Fleischwolf gedreht. Der so erhaltene Muskelbrei von 300 gr wird im doppelten Volumen der o. a. eiskalten Lösung 1,5 min mit einem Starmix zerkleinert. Durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 10 000 . g und 1° C werden Kerne, Fibrillen, Mitochondrien, Sarkolemm und Endplattenteile sedimentiert. Aus dem Überstand, in dem sich noch SPR, kleinere Strukturelemente und das unstrukturierte Myoplasma befinden, wird durch 80-minütiges Zentrifugieren bei 40 000 . g das SPR sedimentiert; bei der elektronenmikroskopischen Kontrolle (Ulbrecht und Kruckenberg, 1965) dieses Rückstandes zeigen sich ausnahmslos tubuläre und vesikuläre Elemente, also Bruchstücke des ttS und des longitudinalen Systems mit seinen tZ.

Die Resuspension des Rückstandes nach 80 min bei 40 000 . g erfolgt mit einem Teflon-Homogenisator in 30 ml "Reaktionslösung" (RL); diese besteht aus 60 mM KCl, 90 mM NaCl und 40 mM $MgCl_2$.

Der Stickstoff-Gehalt dieses Eiweiß-Homogenates beträgt durchschnittlich 4 mg/ml, wenn man die oben angegebenen Mengen bzw. Volumina wählt.

- b) Die Fermentaktivität der AChE wird titrimetrisch bei 37° C und konstantem pH von 7,0 in RL bestimmt, indem die enzymatisch entstehende Essigsäure mit Natronlauge laufend neutralisiert wird. Die ACh-Konzentration im reaktionskinetischen Ansatz beträgt 6 mM. Das ist die Konzentration, bei der die höchste ACh-Umsatzrate unter den gewählten Bedingungen beobachtet

wurde (Ulbrecht und Kruckenberg, 1965).

Es muß vor jeder Umsatzbestimmung der zugehörige Leerwert ermittelt werden. Er besteht aus 2 Anteilen: einer spontanen Säuerung innerhalb des ACh-freien Reaktionsmilieus, die von Ansatz zu Ansatz verschieden stark ist, und der spontanen ACh-Hydrolyse. Die Versuchsbedingungen werden so gewählt, daß der Leerwert nie größer als die Hälfte der Brutto-Umsatzrate ist. Um die spontane Säuerung möglichst niedrig zu halten, wurde das Reaktionsmilieu vor der Messung eine halbe Stunde lang unter CO_2 -freiem Stickstoff gehalten.

- c) Zur radioaktiven Signierung der aktiven Gruppen der AChE wird P^{32} -markiertes Di-isopropyl-fluorphosphat (DFP) von Radiochemical Center Amersham bezogen. Es hat eine spezifische Aktivität zwischen 200 und 400 $\mu\text{Ci/mg}$. Das Tritium-markierte DFP derselben Firma hat eine sehr viel höhere spezifische Aktivität (0,5 - 1,5 mCi/mMol). Allerdings ist der daraus resultierende Substrat-Zerfall durch Selbstbestrahlung beträchtlich, sodaß unübersichtliche Reaktionen zwischen dem Proteinpräparat einerseits und Bestrahlungsprodukten andererseits möglich sind. Aus diesem Grunde konnte das Tritium-DFP nicht zu quantitativen Untersuchungen zur Bestimmung der Wechselzahl, sondern nur zur Kontrolle einiger Methoden verwendet werden.

Um nur die spezifischen Positionen der AChE des SPR-Präparates radioaktiv zu markieren, werden sie nach der von Cohen und Warringa (1953) angegebenen Methode mit Butyrylcholin (BCh) "geschützt", während inaktives DFP mit den nicht durch BCh besetzten unspezifischen Positionen reagiert. Auf diesem Wege kann eine unspezifische Signierung mit DF^{32}P weitgehend unterbunden werden. Das BCh, das als BChI vorliegt, wird durch einen mit HCl vorbehandelten Amberlite-Ionenaustauscher in BChCl überführt. Das SPR-Präparat wird bei Zimmertemperatur und pH 7 unter Schütteln in 0,33 M BChCl 15 min inkubiert. Nachdem diese Suspension mit soviel

DFP versetzt worden ist, daß die Endkonzentration 10^{-5} M ist, wird sie während einer Stunde bei 4° C gehalten. Das BChCl und das nicht gebundene DFP werden durch zweimaliges Zentrifugieren (45 min bei 40 000 . g) mit RL ausgewaschen, d.h. die Konzentrationen von DFP und BChCl werden um den Faktor $5 \cdot 10^4$ erniedrigt.

Dieser Verdünnungsfaktor folgt aus der Überlegung:

Die beiden Inkubationen werden bei einem Gesamtvolumen von 10 ml in einem 100 ml fassenden Zentrifugenröhrchen vorgenommen. Dieses wird zur ersten Zentrifugation mit RL aufgefüllt, sodaß eine 10-fache Verdünnung resultiert. Da der Rückstand nach der Zentrifugation ein Volumen von etwa 1 ccm hat, erfolgt nach neuerlichem Auffüllen des Röhrchens eine weitere Verdünnung von 1:100. Der Rückstand nach der 2. Zentrifugation wird zur Inkubation mit radioaktivem DFP in 50 ml RL aufgerührt.

Somit liegt DFP zum Zeitpunkt der Inkubation mit DF^{32}P in einer Konzentration von nur noch $2 \cdot 10^{-10}$ M vor, d.h. bei einer Konzentration des radioaktiven DFP von 0,5 bis $1 \cdot 10^{-5}$ M konkurriert 1 freies nicht gebundenes radioinaktives DFP-Molekül mit 25 000 bis 50 000 radioaktiven DFP-Molekülen um die aktiven Gruppen der AChE des SPR. Der Auswaschprozeß kann nach dieser Überlegung als ausreichend für die erzielbare Genauigkeit der Signierung betrachtet werden.

Die Konzentration des BChCl wird von $3,3 \cdot 10^{-1}$ M auf $6,6 \cdot 10^{-6}$ M herabgesetzt. Da nach der Abb. 5 die spezifischen Positionen der AChE bei einer BCh-Konzentration von $1,1 \cdot 10^{-2}$ M nicht mehr vor der blockierenden Reaktion mit DFP geschützt werden, sind sie bei der durch die Verdünnungsprozedur erreichten BCh-Konzentration von $6,6 \cdot 10^{-6}$ M als frei für die Reaktion mit DF^{32}P zu betrachten.

Das so vorbehandelte SPR-Präparat, in dem nur die spezifischen ACh-Positionen noch "frei" sind, wird unter Schütteln bei pH 7 in RL von 4° C eine Stunde in 0,5 bis $1 \cdot 10^{-5}$ M DF^{32}P inkubiert. Danach wird das überschüssige nicht gebundene radioaktive DFP durch 5-maliges Zentrifugieren (20 min bei 40 000 . g) in 100 ml fassenden Röhrchen mit 5 %iger Trichlor-essigsäure und $5 \cdot 10^{-7}$ M Träger-DFP ausgewaschen.

- d) Zur Messung der P^{32} -Signierung im SPR wird der Rückstand des letzten Zentrifugationsschrittes im Vakuum getrocknet. 50 mg der Trockensubstanz werden in einem Packard-Zählfläschchen aus Glas mit 3 ml Hyaminhydroxyd versetzt und innerhalb 24 bis 48 Stunden bei 40°C zur Lösung gebracht ¹⁾. Dann werden 17 ml eines Dioxan-Szintillators nach Bray (1960) zugefügt und die Impulse in einem Packard Scintillation Counter bei Kanalbreite 50-1000 und 3,5 %-iger Verstärkung registriert. Der unter diesen Bedingungen mit einem Inneren Standard ermittelte Wirkungsgrad beträgt durchschnittlich 21,4 %. Ein "phosphorescence effect" (Herberg, 1958) wird nicht beobachtet.
- e) Alle Stickstoffbestimmungen werden nach Kjeldahl ausgeführt.

1) Die bei der Lösung der Trockensubstanz in Hyamin auftretende gelbliche Färbung konnte weder durch Ascorbinsäure (Hasselbach; persönliche Mitteilung) noch durch 30 %-iges Wasserstoffperoxyd (Herberg, 1960) aufgehellt werden.

III. Ergebnisse

- a) Die spezifische Umsatzrate der AChE des SPR, das durch fraktionierte Zentrifugation in den Grenzen zwischen 20 min bei 10 000 . g und 80 min bei 40 000 . g gewonnen wurde, beträgt im Mittel 156,8 nVal/min . mg N und ist somit etwa achtmal größer als diejenige der AChE im Gesamthomogenat (Ulbrecht und Kruckenberg, 1965).

Abb. 1 zeigt den Laugenverbrauch über der Zeitabszisse eines Versuches, in dem die Fermentaktivität bestimmt wird. Dabei befinden sich im Reaktionsgefäß 10 ml Gesamtvolumen bei pH 7, 37°C und Ionenstärke 0,27. Die Spontanhydrolyse beträgt 3,8 nVal/min, die Spontansäuerung 7,0 nVal/min. Der Leerwert nimmt also nur 1,34 % des Bruttowertes ein.

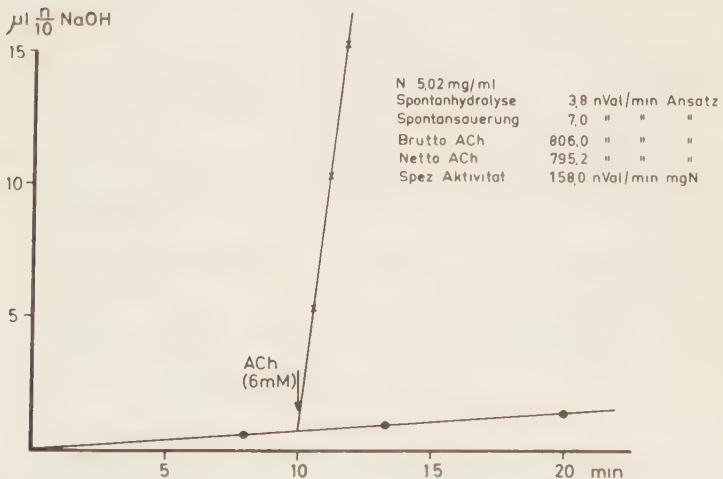


Abb. 1. Umsatzrate der AChE im SPR. Spontane Säuerung nach halbstündigem Durchströmen mit Stickstoff: •—• Laugenverbrauch nach Zugabe von 60 µl ACh 1 M zu 10 ml Gesamtvolumen: x—x. Ordinate: Laugenverbrauch in µl NaOH 0,1 n. Abszisse: Reaktionszeit in Minuten.

In der Abb. 1 a ist die Spontanhydrolyse in Abhängigkeit von der Temperatur und der ACh-Konzentration dargestellt. Aus der Abbildung folgt für die zu der reaktionskinetischen Messung verwendete ACh-Menge von $60 \mu\text{Mol}$ (10 ml einer 6 mM ACh-Lösung) bei 37°C eine Spontanhydrolyse von 3,8 nVal/min, das sind 0,063‰ pro Minute der zu Versuchungsbeginn im Ansatz vorhandenen ACh-Menge.

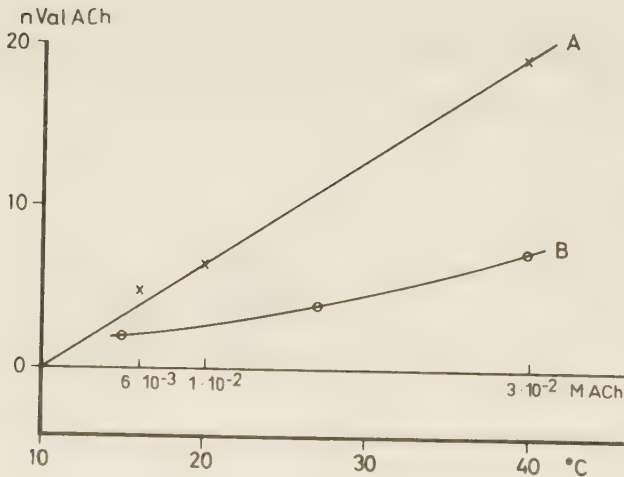


Abb. 1 a. Spontane ACh-Hydrolyse. Kurve A gibt die Abhängigkeit der Hydrolyse von der ACh-Konzentration in dem 10 ml fassenden Meßvolumen bei 37°C , Kurve B die Abhängigkeit von der Temperatur bei 6 mM ACh an.

- b) Zur Signierung der aktiven Gruppen der AChE wird im Unterschied zu Cohen et al. (1953) eine DF^{32}P -Konzentration benutzt, die zu einer totalen Hemmung der Fermentaktivität führt. In Abb. 2 wird diese Hemmung in Abhängigkeit von der DFP-Konzentration gezeigt. Dabei wurde das Enzympräparat 1 Stunde bei 4°C , pH 7 und Ionenstärke 0,27 mit den angegebenen DFP-Konzentrationen versetzt. Danach wurde der überschüssige Inhibitor mit 0,1 M KCl durch zweimaliges, einstündiges Zentrifugieren bei 40 000 . g entfernt. Anschließend wird der ACh-Umsatz durch das praktisch DFP-freie Enzympräparat bei 37°C bestimmt.

Die Abb. 2 zeigt, daß bereits bei einer DFP-Konzentration von $6,3 \cdot 10^{-7}$ M vollständige Hemmung vorliegt. In unseren Versuchen zur Bestimmung der Wechselzahl der AChE im SPR wurde das Enzympräparat in einer noch um eine Zehnerpotenz höher konzentrierten Lösung von radioaktivem $\text{DFP}^{1)}$ inkubiert; bei Inkubationen in nichtradioaktivem DFP war dessen Konzentration sogar 10^{-5} M.

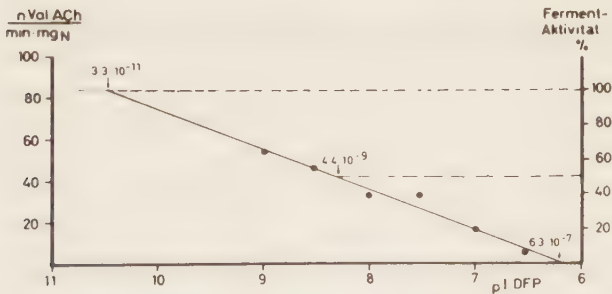


Abb. 2. Fermentaktivität der AChE des SPR als Funktion der DFP-Konzentration. Linke Ordinate: Fermentaktivität in nVal/min · mg N. Rechte Ordinate: Prozent der Fermentaktivität der nichtgehemmten AChE. Abszisse; negativer Logarithmus der DFP-Konzentration.

- 1) Die verwendeten DF^{32}P -Konzentrationen waren $5 \cdot 10^{-6}$ M, $8,4 \cdot 10^{-6}$ M und $9,6 \cdot 10^{-6}$ M.

- c) Als Inkubationsdauer, die zu einer irreversiblen Hemmung der AChE im SPR führen soll, wurde 1 Stunde gewählt. Innerhalb dieser Zeitspanne müssen alle aktiven Gruppen durch DFP besetzt werden, und diese Bindung muß praktisch irreversibel sein.

In der Abb. 3 ist dargestellt, wie die Umsatzrate der AChE zeitabhängig sinkt, wenn Substrat und Inhibitor zur gleichen Zeit dem Ferment zugesetzt werden. Nach 100 Minuten ist sie auf Null abgesunken. Bereits nach einer Stunde ist die Netto-Umsatzrate auf das Niveau des Leerwertes abgesunken, sodaß die späteren Messungen mit einem zu großen Fehler behaftet sind.

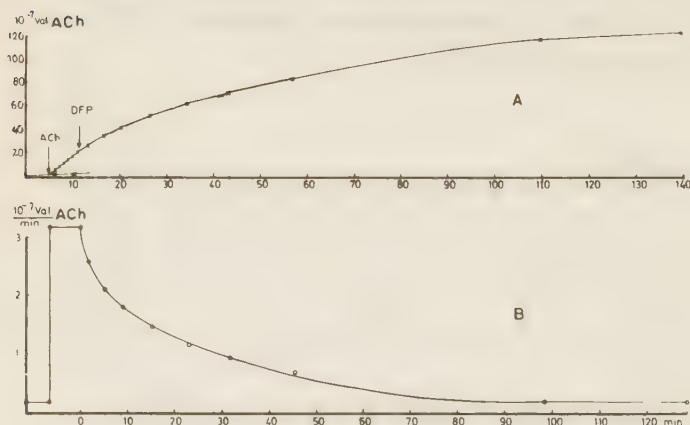


Abb. 3. Einfluß von DFP auf die Umsatzrate der AChE des SPR. Kurve A: Ordinate: Laugenverbrauch in 10^{-7} Val ; Abszisse: Reaktionszeit. Kurve B: Ordinate: 1. Ableitung der Kurve A ($= \frac{dv}{dt}$); Abszisse: Reaktionszeit (t_0 bei DFP-Zugabe). Das Reaktionsmilieu wurde bei 37°C gehalten.

Es ist unter den Bedingungen der Versuche immer $S \gg E_0$ und ebenso $I \gg E_0$. Die Substrateigenhemmung ist klein, weil die benutzte $[S]$ der $[S]_{\text{opt.}}$ entspricht. Die "Alterung" des inhibierten Enzyms wird nicht berücksichtigt, weil die Versuchsdauer klein gegenüber der Halbwertszeit der Alterungsreaktion ist.

Es sind

$[E]$	=	Konzentration des wirksamen Enzyms,
$[ES]$	=	" des Michaelis-Menten-Komplexes,
$[E]_0$	=	" des Enzyms vor Reaktionsbeginn,
$[EI]$	=	" der inhibierten aktiven Gruppe des Enzyms,
$[S]$	=	" des Substrates,
$[I]$	=	" des Inhibitors,
t	=	Reaktionszeit.

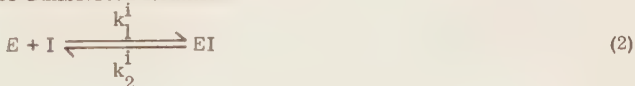
In der Reaktion



ist die Substratumsatzrate

$$\frac{dS}{dt} = v \text{ proportional zu } ES.$$

In der inhibierten Reaktion



$$\text{ist } k_2^i \ll k_1^i.$$

Deshalb läuft unter der Versuchsbedingung, in der $[I] \gg [E_0]$ ist, die Reaktion (2) so weit, bis E ganz in EI übergegangen ist.

Wird in dem Versuchsansatz, der durch die Abb. 3A dargestellt ist, S und I dem E gleichzeitig zugesetzt, nimmt der Substratumsatz mit fortschreitender Zeit ab. Das ist zu erwarten, weil die Reaktion (2) nur in einer Richtung abläuft und damit $[E]$ mit der Zeit kleiner wird bis schließlich $[E_0] = [EI]$ geworden ist und wegen $[E] = 0$ auch $[ES] = 0$ wird.

Da $\frac{dS}{dt}$ proportional $[ES]$ ist, ist dann auch $\frac{dS}{dt} = 0$ geworden. Dies ist in den Abb. 3A und 3B gezeigt. Zur Zeit t_0 gehört die ungehemmte Umsatzgeschwindigkeit v_0 , weil $[EI] = 0$. Im weiteren Verlauf der Reaktion wird $[ES]$ um den Betrag kleiner, um den $[EI]$ zunimmt. $[ES] + [EI]$ kann in erster Näherung gleich $[E_0]$ gesetzt werden, weil $[S]$ und $[I] \gg [E_0]$ sind.

Aus diesem Verhalten muß geschlossen werden, daß in der Reaktion (2) k_2^i gegenüber k_1^i vernachlässigt werden kann. Es liegt eine praktisch irreversible Inaktivierung des Enzyms durch DFP vor. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für die Signierung von E durch radioaktives I - also der AChE durch $DF^{32}P$.

Diese Folgerung wird gestützt durch eine weitere Beobachtung, die am Homogenat des ganzen Muskels gemacht wurde. Zur Prüfung der Irreversibilität der DFP-Bindung an die AChE des Muskels wurde das Homogenat eine Stunde lang in Tritium-DFP $1,3 \cdot 10^{-6}$ M bei 20° C und pH 7 inkubiert. Durch anschließende Dialyse gegen Leitungswasser von 12° C wurde die zeitliche Abnahme der Radioaktivität im Homogenat bestimmt (s. Abb. 4). Das dialysierbare freie H^3 -DFP ist nach 3 - 4 Tagen aus dem Muskelpräparat entfernt. Dies ist an dem scharfen Übergang von schnellem zu sehr langsamem Schwund der Radioaktivität erkennbar. Die zweite, langsame Periode kann durch eine Halbwertszeit von 12 Tagen charakterisiert werden. Während dieser Periode wird Radioaktivität aus Bindungen an das Muskelhomogenat frei, die nicht nach spezifischem und unspezifischem

Charakter unterschieden werden können. Es handelt sich dabei um Radio-

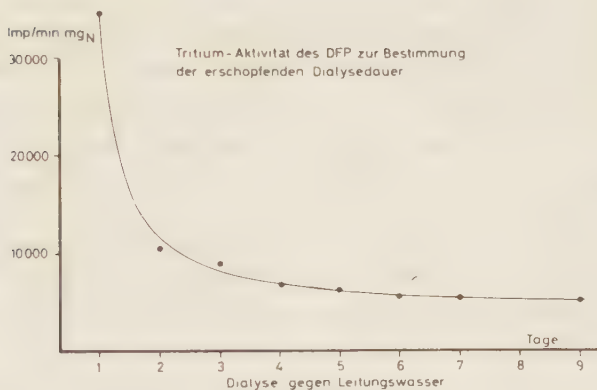


Abb. 4. Dialyse von Tritium-DFP, das $1,3 \cdot 10^{-6}$ M 1 Stunde lang bei 20° C und pH 7 mit einem Gesamthomogenat vom Muskel reagiert hat, im Wisking-Schlauch gegen Leitungswasser von 12° C. Ordinate: Impulse/min . mg N. Abszisse: Dialysedauer in Tagen.

aktivität des H^3 - DFP und von unbekannten Produkten aus der Selbstbestrahlung der H^3 -DFP-Stammlösung. Die Gesamt-Aktivität kann sowohl aus spezifischen als auch aus unspezifischen Bindungen frei werden; die spezifischen sind in Membranfragmenten aus Endplattenbereichen, in möglichen Nerven- und Erythrocyten-Bruchstücken und im SPR zu suchen. Die Rate der P^{32} -Abgabe in der zweiten, langsamen Periode kann als obere Grenze für die Geschwindigkeit der Rückreaktion in der Reaktionsgleichung (2) - siehe Seite 13 - angesehen werden. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß die tatsächliche Abgaberate von $DF^{32}P$ aus spezifischen Bindungen an

aktive Gruppen der AChE des SPR viel geringer ist. Es kann deshalb angenommen werden, daß während der Zeit, in der das nicht gebundene DFP durch Dialyse bzw. Auswaschen entfernt wird, die Bindung des DFP an die AChE des SPR nicht meßbar gelöst wird. Damit ist es zulässig, von der nach Auswaschen gemessenen DF^{32}P -Aktivität auf die vorhandenen aktiven AChE-Gruppen zu schließen.

Tab. 1

Inkubationszeit in Stunden	Signierungsdichte des Proteins (Moleküle DFP/mg N)
0,5	$3,99 \cdot 10^{12}$
1,0	$4,33 \cdot 10^{12}$
1,5	$3,91 \cdot 10^{12}$
2,0	$4,09 \cdot 10^{12}$
4,0	$5,26 \cdot 10^{12}$
6,0	$4,61 \cdot 10^{12}$

In der Tabelle 1 wird gezeigt, daß die Verlängerung der Protein-Inkubation in der Signierungslösung über 30 Minuten hinaus keinen erkennbaren Einfluß mehr auf die Radioaktivität hat, die an die Proteine gebunden bleibt. In dieser Tabelle ist die pro mg Stickstoff der Proteinsuspension (Gesamthomogenat des Skelettmuskels) gebundene Radioaktivität mit der spezifischen Aktivität des Signierungspräparates umgerechnet. Daraus folgt die Zahl

der pro mg Protein-Stickstoff gebundenen DFP-Moleküle. Die damit erhaltene Signierungsdichte streut zwischen 3,91 und $5,26 \cdot 10^{12}$ Molekülen DFP/mg N.

- d) Das fettlösliche DFP hat außer der Reaktionsbereitschaft mit den aktiven Gruppen der AChE auch die Fähigkeit sich physikalisch in den Membranlipoproteiden zu lösen und dort auch während der Waschung mit wässrigen Lösungen zu bleiben. Bei Auswaschen in einer wässrigen Lösung mit inaktivem DFP ($5 \cdot 10^{-7}$ M) wird das möglicherweise in den Membranlipoproteiden gelöste radioaktive DFP ausgetauscht und damit entfernt.

Zur sicheren Vermeidung dieser Fehlerquelle haben Cohen und Warringa (1953) diese unspezifischen Positionen vor der Behandlung mit radioaktivem DFP durch inaktives DFP besetzen lassen. Dazu wird die aktive Gruppe der AChE durch eine hohe BCh-Konzentration vor der Reaktion mit 15 Minuten später zugesetztem DFP geschützt, während alle unspezifischen Gruppen für das DFP zugänglich bleiben. Nach Entfernung des BCh und des nicht gebundenen DFP sind die aktiven Gruppen der AChE für die irreversible Reaktion mit radioaktivem DFP frei verfügbar.

Aus der Abb. 5 wird ersichtlich, daß BCh in einer Konzentration von 0,33 M für einen vollständigen Schutz der aktiven Gruppen der AChE ausreichend ist. Die Enzym-Suspension wird 15 Minuten bei 20°C unter Schütteln in BCh-Lösungen verschiedener Konzentration inkubiert; danach wird noch DFP in einer Endkonzentration von 10^{-5} M zugegeben und 1 Stunde bei 4°C geschüttelt. Das BCh und das nicht gebundene DFP werden durch 2 Zentrifugationen (45 Minuten bei 40 000 . g) in RL entfernt. Schließlich wird die Fermentaktivität der Rückstände gemessen.

- e) In einer Untersuchungsserie wurde geprüft, wieviele 20-minütige Zentrifugationen in 5 %iger Trichloressigsäure in 100 ml fassenden Röhrchen bei 40 000 . g nötig sind, um das nicht gebundene radioaktive DFP aus der Enzym-Suspension vollständig zu entfernen. Hierzu wurde eine SPR-Präparation in 10^{-5} M DF^{32}P 1 Stunde bei 4°C unter Schütteln inkubiert und danach zentrifugiert. In der Tab. 2 ist die Radioaktivität der Rückstände

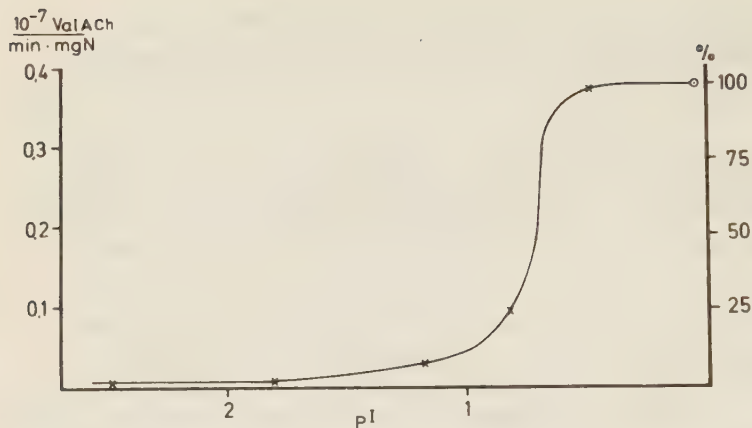


Abb. 5. Abhängigkeit des Schutzeffektes des BCh für die aktiven Gruppen der AChE im SPR von der BCh-Konzentration. Die SPR-Präparation wurde zunächst mit BChCl verschiedener Konzentration inkubiert, anschließend mit 10^{-5} M DFP. Dann wurde zweimal 45 min bei 40 000 . g zentrifugiert und die Fermentaktivität der Rückstände ermittelt. Linke Ordinate: Fermentaktivität; rechte Ordinate: Fermentaktivität in Prozent von derjenigen der nicht behandelten Präparation ($\odot$). Abszisse: negativer Logarithmus der BChCl-Konzentration.

nach der 2. bis 5. Waschung angegeben, zudem die Radioaktivität im Rückstand nach der 3. und 5. Waschung bezogen auf die Radioaktivität im Rückstand nach der 2. Waschung. Bereits nach der 2. Waschung ist die Radioaktivität im Rückstand durch weitere Zentrifugationen nur noch unwesentlich zu vermindern.

Im Vergleich zur Radioaktivität, die nach den einzelnen Waschungen im Rückstand noch verbleibt, wird in der Abb. 6 die schrittweise Abnahme der Radioaktivität im Überstand gezeigt. Die Abb. 6 macht deutlich, daß 5 der-

Tab. 2 Anzahl der für die Entfernung nicht gebundenen Signierungsstoffes erforderlichen Waschungen

	I/min . mg N (Im Rückstand)	%
nach 2. Zentrifugation	8500	100
" 3. "	7400	87
" 4. "	6100	72
" 5. "	5750	68

artige Waschungen notwendig sind, um das nicht gebundene $DF^{32}P$ mit Sicherheit zu eliminieren. Denn erst nach der 5. Zentrifugation befindet sich die Impulsrate im Bereich des Leerwertes.

- f) In der Tab. 3 wird das Vorgehen während der Signierung und anschließenden Elimination nicht gebundenen Signierungsstoffes gezeigt, das zur Ermittlung der Anzahl aktiver Gruppen AChE pro mg Stickstoff des SPR-Präparates führt.

In der Reihe A sollten nur die spezifischen Positionen (=aktive Gruppen) erfaßt werden.

Aus der Reihe B geht jedoch hervor, daß trotz vorherigen Angebotes von inaktivem DFP noch eine beträchtliche Menge radioaktivem DFP unspezifisch gebunden wird.

Somit erhält man die aktiven Gruppen der AChE aus der Differenz von A und B.

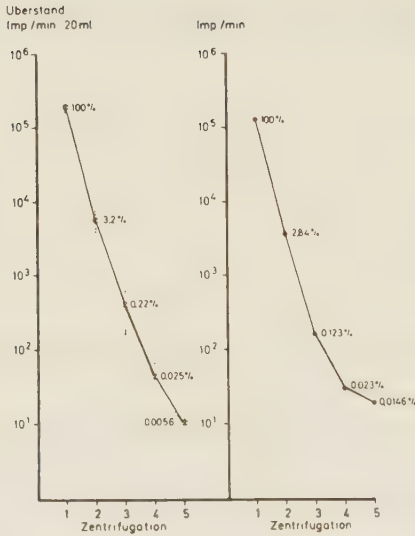


Abb. 6. Abnahme der Radioaktivität in den Überständen nach jeweils 20-minütigem Zentrifugieren bei 40 000 . g in 5 %iger Trichloressigsäure. Links: Messung der Cerenkov-Strahlung im Packard Scintillation Counter bei Kanalbreite 50-1000 und Verstärkung von 10 %. Rechts: Messung mit Geiger-Müller-Zählrohr. Ordinaten: Imp/min. Abszissen: Anzahl der Zentrifugationen.

In der Reihe C, in der nur in $DF^{32}P$ inkubiert wird, werden sämtliche Bindungen erfaßt, die $DF^{32}P$ mit der SPR-Präparation eingehen kann. Sie dient im Vergleich mit Reihe B als grobe Kontrolle, inwieweit das inaktive DFP spezifische und unspezifische Positionen besetzt hat.

Tab. 3

	Reihe A	Reihe B	Reihe C
<u>1. Schritt:</u> Inkubation in 0,33 M BChCl	+	-	-
<u>2. Schritt:</u> Inkubation in 10 μ M DFP	+	+	-
<u>3. Schritt:</u> Auswaschen von BChCl und DFP durch Zentrifu- gieren in RL (2 x 45 min bei 40 000 . g)	+	+	+ ¹⁾
<u>4. Schritt:</u> Inkubation in 5 - 10 μ M DF ³² P	+	+	+
<u>5. Schritt:</u> Auswaschen des nicht ge- bundenen DF ³² P durch Zentri- fugieren in 5 %iger Trichlor- essigsäure (5 x 20 min bei 40 000 . g)	+	+	+
<u>6. Schritt:</u> Bestimmung der Radioaktivität im Rückstand nach Zentrifugation (s. 5. Schritt)	+	+	+

1) wird parallel zentrifugiert, um die Gleichartigkeit der Bedingungen zu gewährleisten.

- g) Aus der Differenz der Impulse von Reihe A und B berechnet sich die Anzahl der $DF^{32}P$ -Moleküle (und damit der aktiven Gruppen AChE) pro mg Stickstoff der SPR-Präparation folgendermaßen:

$$N = \frac{d \cdot L}{k \cdot \eta \cdot C \cdot M} \quad (3)$$

wobei

N = Zahl der aktiven AChE-Gruppen im SPR,

d = Differenz der Impulse zwischen Reihe A und B,

L = Loschmidt'sche Zahl,

k = Anzahl der radioaktiven Zerfälle pro min und pro mCi,

η = Wirkungsgrad der Zählordnung,

C = spezifische Aktivität des zur AChE-Markierung benutzten radioaktiven DFP in $\frac{mCi}{mg \text{ DFP}}$

M = Molekulargewicht des DFP in $\frac{mg}{Mol}$.

Die Wechselzahl WZ (pro min) berechnet sich dann aus dem Quotienten

$$WZ = \frac{V \cdot L}{N} \quad (\text{min}^{-1}) \quad (4)$$

wobei

V = Umsatzrate der SPR-AChE für ACh in Val pro min und pro mg N des Präparates,

L = Loschmidt'sche Zahl,

N = siehe Gleichung (3).

- h) In der Tab. 4 sind die Ergebnisse aus 14 Versuchen zusammengestellt. Die Wechselzahlen streuen zwischen $22\,900 \text{ min}^{-1}$ und $121\,300 \text{ min}^{-1}$. Der Mittelwert beträgt $63\,000 \text{ min}^{-1}$, die mittlere Abweichung vom Mittelwert $19\,600 \text{ min}^{-1}$.

Tab. 4

Nr. der Präparation	Differenz B - A in $\frac{\text{Imp}}{\text{min} \cdot \text{mg N}}$	<u>aktive Gruppen</u> $\frac{\text{mg N}}{\text{x lo}^{12}}$	Wechselzahl min^{-1}
1	55,8	1,16	72 600
2	90,2	1,875	44 900
3	91,0	1,442	65 500
4	49,2	0,781	121 000
5	87,9	1,394	67 900
6	88,9	1,41	67 100
7	99,5	1,58	59 900
8	104,5	1,66	57 000
9	49,1	0,779	121 300
10	77,2	1,49	63 400
11	186,5	3,59	26 300
12	96,7	1,865	50 600
13	213,5	4,12	22 900
14	115,3	2,225	42 400
Mittelwert		1,81	63 000

- i) Zur Errechnung der Anzahl der tZ pro mg ist eine Muskelfaser angenommen worden, die 1 gr wiegt und einen Durchmesser von $60 \mu\text{m}$ hat. Bei einem spezifischen Gewicht von 1 hat sie eine Länge L von 354 m, denn

$$\begin{aligned} L &= \frac{\text{Volumen}}{\text{Fläche}} \\ &= \frac{10^{12} (\mu\text{m}^3)}{r^2 \pi (\mu\text{m}^2)} \\ &= \frac{10^{12}}{2,825 \cdot 10^3} \frac{(\mu\text{m}^3)}{(\mu\text{m}^2)} \\ &= 3,54 \cdot 10^8 \mu\text{m} \\ &= 354 \text{ m.} \end{aligned}$$

Da nur $2/3$ des Faserquerschnitts aus Fibrillen besteht und der Durchmesser einer Fibrille etwa $1,1 \mu\text{m}$ beträgt, ist die Anzahl der Fibrillen in der angenommenen Faser

$$\begin{aligned} &= \frac{30^2 \pi \cdot 2}{0,55^2 \pi \cdot 3} \\ &= 1983 \end{aligned}$$

Bei einer Sarkomerenlänge von $2,65 \mu\text{m}$ besitzt eine 354 m lange Fibrille

$$\begin{aligned} &\frac{3,54 \cdot 10^8}{2,65} \\ &= 1,335 \cdot 10^8 \text{ Sarkomeren.} \end{aligned}$$

Daraus folgt die Anzahl der Sarkomeren in der angenommenen 1 gr schweren und 354 m langen Faser:

$$\begin{aligned} &1,335 \cdot 10^8 \cdot 1983 \\ &\approx 2,64 \cdot 10^{11} \text{ Sarkomeren.} \end{aligned}$$

Jede Sarkomere enthält 4 tZ. Deshalb enthält diese Faser

$$1,056 \cdot 10^{12} \text{ tZ.}$$

Aus 300 gr Muskelbrei (Frischgewicht) gewinnt man eine SPR-Fraktion mit einem Gesamt-Stickstoff-Gehalt von etwa 120 mg¹⁾. Unter der Annahme, daß bei der Präparation 50 % des SPR verlorengelht, kann die Rasterdichte der AChE in den tZ in erster Annäherung wie folgt überschlägig geschätzt werden:

Aus 1 gr Frischmuskel werden

$$\frac{120 \cdot 2}{300} = 0,8 \text{ mg N}$$

als SPR-Präparat gewonnen. Dieses enthält neben den tZ auch andere Anteile des gesamten SPR.

Der Stickstoffgehalt einer einzelnen tZ beträgt als obere Grenze

$$\frac{0,8}{1,056 \cdot 10^{12}} = 0,76 \cdot 10^{-12} \text{ mg N / tZ}$$

Die Anzahl der aktiven AChE-Gruppen kann dann mit der Anzahl der in Tabelle 4 auf 1 mg N bezogenen aktiven Gruppen berechnet werden:

$$\frac{0,76 \cdot 10^{-12}}{1,81 \cdot 10^{-12}} = 1,4 \text{ aktive Gruppen / tZ}$$

1) Hasselbach (1964) gibt bei Präparation des SPR in Salzlösung zwischen 8000 . g 10 min und 25 000 . g 60 min eine Ausbeute von 2 mg N pro 1 gr Muskelfrischgewicht an. Diese Ausbeute ist fünfmal größer als die eigene (0,4 mg N / gr Muskelfrischgewicht). Da wir zwischen 10 000 . g 20 min und 40 000 . g 80 min zentrifugierten, ist eine kleinere, dafür reinere Fraktion zu erwarten.

IV

Diskussion

Die durch radioaktive Signierung der AChE im SPR und durch Bestimmung der Umsatzrate von ACh errechnete Wechselzahl streut über etwa eine Zehnerpotenz. Die Streubreite hat vornehmlich ihre Ursache in der quantitativen Entfernung der DF^{32}P -Moleküle, die praktisch nicht irreversibel an die AChE gebunden wurden. Während der Inkubation der SPR-AChE in $0,5 - 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ DF^{32}P stehen ungefähr $30 \mu\text{Ci}$ nicht gebundenes DF^{32}P $1,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{Ci}$ gebundenem DF^{32}P gegenüber. Daraus folgt, daß nur $0,04\%$ der nicht gebundenen Radioaktivität, die im Endpräparat verbleibt, schon zu einem Fehler von 100% Veranlassung gibt. Es würde in diesem Beispiel die Zahl der aktiven Gruppen doppelt so hoch erscheinen, als sie tatsächlich ist. Damit würde auch die Wechselzahl entsprechend kleiner. Sie betrüge in diesem Beispiel nur die Hälfte der tatsächlichen.

Aus dieser Überlegung muß man ableiten, daß den Messungen, die zu einer kleinen Wechselzahl führen (s. Tab. 4, Präparation 2, 11, 13 und 14), ein geringeres Gewicht bei der Mittelung der Versuchsergebnisse beizumessen ist als den hohen Wechselzahlen der Präparationen 4 und 9.

Unter Berücksichtigung dieses Gedankens ergibt sich ein Mittelwert von $74\,600 \text{ min}^{-1}$.

Hiergegen läßt sich einwenden, daß während der Gefriertrocknung die nicht gebundenen DF^{32}P -Moleküle wegen des geringen Dampfdruckes ($\text{Kp}_{21} = 78 - 84,8^\circ \text{C}$; $\text{Kp}_{16} = 73^\circ \text{C}$) und des tiefen Gefrierpunktes ($F = -82^\circ \text{C}$) aus dem Präparat entfernt werden könnten.

Ein systematischer Fehler, der zu einer scheinbar großen Wechselzahl führen muß, kann in der Reaktivierung der DFP-blockierten AChE liegen. Die Reaktivierungsgeschwindigkeit wurde geprüft und als vernachlässigbar identifiziert (s. Abb. 4). Außerdem wurde während des Auswaschens des nicht gebundenen radioaktiven DFP streng darauf geachtet, daß die Zeitspanne zwischen Ende der Inkubation und Ende der Gefriertrocknung gleich

groß war.

Ein weiterer Grund für eine scheinbare Erhöhung der Wechselzahl kann in einem unvollständigen Schutz der spezifischen aktiven Gruppen der AChE durch BCh vor der Reaktion mit inaktivem DFP liegen. Dabei wird die Zahl der noch verbleibenden spezifischen aktiven Gruppen, die nach Auswaschen des BCh mit DF^{32}P signiert werden können, kleiner, die Wechselzahl entsprechend größer. Die Abb. 5 zeigt, daß bereits bei einer BCh-Konzentration von 0,2 M ein praktisch vollständiger Schutz erreicht wird. In den Versuchen wurde eine um den Faktor 1,6 höhere Konzentration benutzt. Damit scheinen Argumente entkräftet, die auch den hohen Wechselzahlen (s. Tab. 4, Präparation 4 und 9) ein geringeres Gewicht beimessen.

Man muß aus dargelegten Gründen den Mittelwert der Wechselzahl von $63\ 000\ \text{min}^{-1}$ als untere Grenze der tatsächlichen Werte betrachten.

Tab. 5

Cholin-Esterase enthaltende Struktur	Wechselzahl	Autoren
Elektrisches Organ des Electrophorus electricus	670 000	Rothenberg und Nachmansohn (1947)
Elektrisches Organ des Electrophorus electricus	420 000	Michel und Krop (1951)
Menschliche Erythrozyten	300 000	Myers (s. Cohen und Warringa, 1953)
Erythrozyten vom Rind	295 000	Cohen und Warringa (1953)
Erythrozyten vom Menschen, Pferd, Hund und von der Ratte	10 000 - 171 000	Berry (1951)
SPR vom Kaninchen	23 000 - 121 000	

Die experimentell bestimmten Wechselzahlen solcher AChE, die zu erregbaren Strukturen (elektrisches Organ des *Electrophorus electricus*) gehören, sind etwa 5 bis 9 mal größer als die der AChE im SPR des Skelettmuskels. In jenen kommt der AChE eine eindeutige Funktion zu, nämlich die Zerstörung der ACh-Molekel, die während der Erregungsübertragung aus Vesikeln freigesetzt wurden.

Die an der AChE der Erythrozyten gemessene Wechselzahl ist 3 bis 4 mal größer als diejenige der AChE im SPR. Leider läßt sich über die Genauigkeit der von Cohen und Warringa (1953) angewendeten Methoden nichts aussagen, weil die im Experiment gemessenen Werte nicht angegeben wurden. Die von den Autoren zur Inkubation benutzten DFP- und DF^{32}P -Konzentrationen sind 10^4 bis 10^5 mal kleiner als die von uns benutzten. Es wurde auch nicht gezeigt, daß die von ihnen benutzten Konzentrationen zur vollständigen Signierung ausreichen. Es kann also die Vermutung nicht ausgeschlossen werden, daß die Signierung der aktiven AChE-Gruppen unvollständig war und deshalb die Wechselzahl zu groß erscheint.

Berry (1951) dagegen mißt an den Erythrozyten von Menschen, vom Pferd, vom Hund und von der Ratte Wechselzahlen, die im Bereich unserer eigenen liegen.

Die funktionelle Bedeutung der AChE in den Erythrozyten ist noch völlig unbekannt. Die Rasterdichte der AChE auf der Erythrozyten-Membran ist gering:

Auf $0,27 \mu\text{m}^2$ entfällt eine aktive Gruppe (wenn die Anzahl aktiver Gruppen pro Erythrozyt mit 520 - laut Cohen und Warringa - angenommen wird).

Wenn eine tZ 1 bis 3 aktive Gruppen besitzt, wird die Rasterdichte auf der Membran der tZ ebenfalls klein bleiben. Nimmt man jedoch an, daß die AChE der tZ nur im Kontaktbereich zum ttS existiert, muß die Rasterdichte entsprechend größer sein. Der Kontaktbereich kann in erster Annäherung mit $0,09 \mu\text{m}^2$

berechnet werden. Da nach Bestrahlungsversuchen mit Elektronen, Protonen und Alpha-Teilchen (Serlin und Fluke, 1956) die Größe der AChE-Molekel im elektrischen Aal als bestahlungsempfindliches AChE-Volumen bei Annahme einer zylindrischen Gestalt eine Länge von $360 \text{ \AA}$ und einen Durchmesser von $21 \text{ \AA}$ ausmacht, folgt daraus eine Oberfläche der AChE im Membranraster von etwa $7,6 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2$. Bei Annahme von 2 aktiven Gruppen entfielen also $1,5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2$ Ferment-Oberfläche auf $0,09 \mu\text{m}^2$ Kontaktfläche. Dies bedeutet, daß ungefähr 0,2 % der Kontaktfläche zwischen tZ und ttS mit AChE besetzt sind.

Dagegen würde die analoge Berechnung zu einer 0,03%igen Besetzung der Erythrozyten-Oberfläche mit aktiven AChE-Gruppen führen.

Die Rasterdichte in den cholinergen Synapsen ist 10 bis 100 mal größer. Dies kann überschlagsmäßig errechnet werden aus dem Gesamt-ACh-Umsatz einer Endplatte, der Wechselzahl und der Gesamt-Oberfläche der subsynaptischen Membran. Diese Berechnung ist von Ulbrecht (1966; S. 110/111) durchgeführt.

Es heben sich also Wechselzahl und Rasterdichte der AChE im Erythrozyten deutlich von den gleichen Größen cholinergere synaptischer Strukturen ab. Rasterdichte und Wechselzahl der AChE in den tZ ist etwa so groß wie beim Erythrozyten. Eine funktionelle Zuordnung der AChE in der Erythrozyten-Membran zur Ionenpermeabilität konnte bisher nicht erwiesen werden. Es konnte nicht einmal ein Hinweis dafür gefunden werden. Bisher kann die Fähigkeit der Erythrozyten-Membran ACh zu spalten immer noch als ein zufälliges Ergebnis betrachtet werden, das aus einem Oberflächen-Raster der Erythrozyten-Membran folgt.

Die gleiche Annahme ist auch für die AChE-Funktion der tZ zulässig, obgleich diese Membran ihre Permeabilität für Ca-Ionen während des Arbeitszyklus des Muskels ändern kann. Für eine unspezifische und damit zufällige Fähigkeit zur ACh-Hydrolyse durch die Membran der tZ spricht auch der kleine Temperaturkoeffizient. Er unterscheidet sich in dem Bereich zwischen 10 und

37° C nur um den Faktor 1,2 bis 1,3 von dem Temperaturquotienten der spontanen Hydrolyse.

Wenn das ACh-AChE-System bei der Ca-Ionen-Freisetzung aus den tZ von Bedeutung wäre, müßten Ca-Ionen aus Erschlaffungs-Vesikeln durch ACh freigesetzt werden können. Dieses ist bisher weder in vitro (Ulbrecht und Mayer) noch in sarkolemm-losen Fibrillenbündeln (Costantin und Podolsky, 1966) gelungen.

Aus der vorgelegten Arbeit kann zunächst wegen der im Verhältnis zu spezifischen cholinergen Strukturen geringen ACh-Wechselzahl kein Argument für die funktionelle Relevanz des AChE-ACh-Systems bei der Ca-Ionen-Freisetzung aus den tZ während des Aktivierungsvorganges gewonnen werden. Es wird vielmehr wahrscheinlich gemacht, daß die Fähigkeit der Membran der tZ ACh zu spalten zufällig und unspezifisch ist. Es bleibt jedoch noch die Möglichkeit offen, daß ACh auf die Freisetzung der Ca-Ionen nur vom Lumen des ttS her wirken kann. Die lumenwärts gerichtete Membranfläche war weder in den Versuchen von Ulbrecht und Mayer noch in denen von Constantin und Podolsky (1966) für die experimentell zugesetzte ACh zugänglich. Denn das bekannte "healing-over" schließt die experimentell geöffneten Tubuli und Vesikel sofort wieder. Die geringe Permeabilität der Membranen erregbarer Zellen für ACh ist durch die Nachmansohn'sche Schule quantitativ gesichert.

V.

Zusammenfassung

- 1.) Es wurde durch fraktionierte Zentrifugation in 0,1 M KCl das Sarkoplasmatische Retikulum (SPR) der Skelettmuskeln von Kaninchen präpariert. Das Sediment zwischen 20 min bei 10 000 . g und 80 min bei 40 000 . g wurde als SPR, das von verunreinigenden Gewebsfragmenten fast frei ist, auf seine Acetylcholin (ACh)-Umsatzrate, auf die pro mg N und pro terminale Zisterne (tZ) vorhandenen aktiven Gruppen der Acetylcholin-Esterase (AChE) und deren Wechselzahl untersucht.
- 2.) Die Fermentaktivität der AChE im SPR beträgt durchschnittlich 156,8 nVal/min . mg N.
- 3.) Bei einer einstündigen Prael-Inkubation des SPR-Präparates in Di-isopropylfluorophosphat (DFP) ist eine Konzentration des DFP von mindestens $6,3 \cdot 10^{-7}$ M erforderlich, um eine vollständige Hemmung der AChE zu erzielen.
- 4.) Ein vollständiger Schutz der aktiven Gruppen der AChE des SPR gegenüber der DFP-Hemmung wird durch eine viertelstündige Inkubation der Enzympräparation in 0,33 M Butyrylcholin-Chlorid gewährleistet. Bei der nur etwas geringeren Konzentration von 0,11 M besteht nur etwa 50 %iger Schutz.
- 5.) Die Wechselzahl der AChE im SPR schwankt zwischen $22\,900\text{ min}^{-1}$ und $121\,300\text{ min}^{-1}$ um den Mittelwert von $63\,000\text{ min}^{-1}$.
- 6.) Auf 1 mg N des SPR entfallen $1,81 \cdot 10^{12}$ aktive Gruppen AChE, auf eine tZ 1,4 aktive Gruppen AChE.
- 7.) Die aktiven Gruppen der AChE wurden mit DF^{32}P markiert. In Kontrollversuchen wurde auch mit Tritium-DFP signiert.

Literatur

- Berry, W.K., Biochem.J. 49, 615 (1951)
"The turnover number of cholinesterase"
- Bray, G.A., Anal.Biochem. 1, No. 4-5, 279 (1960)
"A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter"
- Cohen, J.A., Warringa, M.G.P.J., Biochim. Biophys. Acta 11,
52 (1953) "Methods to estimate the turnover number of preparations of ox red cell cholinesterase"
- Costantin, L. L., Franzini-Armstrong, C., Podolsky, R.J., Science 147,
158 (1965) "Localisation of calcium-accumulating structures in striated muscle fibres"
- Costantin, L. L., Podolsky, R.J., Ann. NY Acad. Sci. 137, 1038 (1966)
"The internal membrane system und muscle activation"
- Davies, R. E., Nature 199, 1068 (1963) "A molecular theory of muscle contraction: calcium-dependent contractions with hydrogen bond formation plus ATP-dependent extensions of part of the myosin-actin cross-bridges"
- Ebashi, S., Lipmann, F., J. Cell Biol. 14, 389 (1962)
"Adenosine Triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle"
- Endo, M., Nature 202, 1115 (1964)
"Entry of a dye into the sarcotubular system of muscle"
- Franzini-Armstrong, C., Porter, K.C., J. Cell. Biol. 22, 675 (1964)
"Sarcolemma invaginations constituting the T-system in fish muscle fibres"
- Freygang, W.H., Goldstein, D.A., Hellam, D.C., J. Gen. Physiol. 47/2,
929 (1963) "The after-potential that follows trains of impulses in frog muscle fibres"
- Freygang, W.H., Goldstein, D.A., Hellam, D.C., Peachey, L.D., J. Gen. Physiol. 48/1, 235 (1964) "The relation between the late after-potential and the size of the transverse tubular system of frog muscle"

- Hasselbach, W., Zeitschrift für Naturforschung 7b, 163 (1952) "Die Umwandlung von Aktomyosin-ATPase in L-Myosin-ATPase durch Aktivatoren und die resultierenden Aktivierungseffekte"
- Hasselbach, W., Progr. in Biophysics 14, 167 (1964)
"Relaxing factor and the relaxation of muscle"
- Hasselbach, W., Schneider, G., Biochem. Zeitschrift 321/6, 461 (1951)
"Der L-Myosin- und Aktingehalt des Kaninchenmuskels"
- Herberg, R. J., Science 128, 199 (1958) "Phosphorescence in liquid scintillation counting of proteins"
- Herberg, R. J., Anal. Chem. 32, 42 (1960) "Determination of Carbon-14 and Tritium in blood and other whole tissues. Liquid scintillation counting of tissues"
- Huxley, H. E., Nature 202, 1067 (1964) "Evidence for continuity between the central elements of the triads and extracellular space in frog sartorius muscle"
- Michel, H. O., Krop, S., J. Biol. Chem. 190, 119 (1951) "The reaction of cholinesterase with Diisopropyl-fluorophosphate"
- Peachey, L. D., Huxley, A. F., J. Cell. Biol. 13, 177 (1962)
"Structural identification of twitch and slow striated muscle fibres of the frog"
- Peachey, L. D., Huxley, A. F., J. Cell. Biol. 23, 70 A (1964)
"Transverse tubules in crab muscle"
- Peachey, L. D., J. Cell. Biol. 25, 209 (1965)
"The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius"
- Portzehl, H., Schramm, G., Weber, H. H., Zeitschrift für Naturforschung 5b, 61 (1950) "Aktomyosin und seine Komponenten, 1. Mitt."

- Portzehl, H., Caldwell, P. C., Rüegg, J. C., Biochim. Biophys. Acta 79, 581 (1964) "The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab *Maia Squinado* on the internal concentration of free calcium ions"
- Portzehl, H., Zaoralek, P., Grieder, A., Pflügers Archiv 286, 44 (1965) "Der Calcium-Spiegel in lebenden und isolierten Muskelfibrillen von *Maia Squinado* und seine Regulierung durch die sarkoplasmatischen Vesikel"
- Rothenberg, M. A., Nachmansohn, D., J. Biol. Chem. 168, 223 (1947) "Studies on cholinesterase. III. Purification of the enzyme from electric tissue by fractional ammonium sulfate precipitation"
- Serlin, I., Fluke, D. J., J. Biol. Chem. 223, 727 (1956) "The size and shape of radiosensitive AChE-unit"
- Ulbrecht, G., Habilitationsschrift an der Medizinischen Fakultät München (1966) "Zur Koppelung von Erregung und Kontraktion im Skelettmuskel"
- Ulbrecht, G., Kruckenberg, P., Nature, 206, 305 (1965) "Acetylcholinesterase in the Sarcoplasmic Reticulum of skeletal muscle"
- Ulbrecht, G., Mayer, C.-J., nicht veröffentlichte Versuche
- Weber, A., Herz, R., Reiss, I., J. Gen. Physiol. 46/2, 679 (1962) "On the mechanism of the relaxing effect of fragmented Sarcoplasmic Reticulum"
- Weber, H. H., Arzneimittelforschung 10, 404 (1960) "Der Mechanismus der Kontraktion und der Erschlaffung des Muskels"

Lebenslauf

Am 7.10.1939 wurde ich, Wolf Theodor Endres als Sohn des Oberleutnants Walter Philipp Endres und seiner Frau Gisela, geb. Bühring-Uhle, in Schwerin/Meckl. geboren. Im Frühjahr 1945 flohen wir nach Traunstein/Obb. zu den Eltern meines Vaters.

Dort kam ich im Herbst 1945 in die Volksschule, 1949 in die Oberrealschule. Von 1953 bis 1957 war ich in einem Internat in Berchtesgaden. Im Frühjahr 1959 machte ich am Helmholtz-Gymnasium in Karlsruhe das Abitur.

Anschließend leistete ich meinen Grundwehrdienst ab.

Im Herbst 1960 begann ich in München mit dem Medizin-Studium. Dort bestand ich im Herbst 1961 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Frühjahr 1963 die ärztliche Vorprüfung.

Das 1. klinische Semester studierte ich in München. Während dieser Zeit war ich im Physiologischen Praktikum als Demonstrator tätig.

Ab Herbst 1963 studierte ich ein Jahr an der Medizinischen Fakultät von Paris.

Die letzten vier Semester verbrachte ich wieder in München, wo ich in der Zeit vom 4.9. bis 22.12.66 die ärztliche Prüfung ablegte.

Die ersten drei Monate des Jahres 1967 verbrachte ich als Assistent im Physiologischen Institut der Universität München, wo ich die Versuche zu meiner Dissertation abschloß.

Vom 1.4. bis 31.7.67 war ich als Medizinalassistent an der Chirurgischen Klinik Krecke in München (Chefarzt Prof. Dr. W. Fick) beschäftigt.

Zur Zeit bin ich an der Privat-Frauenklinik Dr. Vogel in Furth bei München tätig.

